

DOI: 10.12264/JFSC2024-0014

不同饵料时期加州鲈仔稚鱼肠道微生物物种多样性和相对丰度变化

田璐¹, 李永吉², 张艳春³, 李文辉², 梁志强¹, 谢仲桂¹, 易大庆⁴, 易湘开⁴, 肖光明³

1. 湖南省水产科学研究所, 湖南 长沙 410153;

2. 岳阳市农业科学研究院, 湖南 岳阳 414400;

3. 湖南省畜牧水产事务中心, 湖南 长沙 410006;

4. 华容县东山洞庭大口鲈良种繁殖场, 湖南 岳阳 415000

摘要: 为了解加州鲈(*Micropterus salmoides*)仔稚鱼类的肠道微生物随食性转化演替变化规律, 连续采集分别代表摄食生物饵料时期(LP)、第 1 个转饵期(CP1)、第 2 个转饵期(CP2)及完全配合饲料时期(FP)的 13、19、24 和 46 日龄的加州鲈肠道内容物, 采用 16S rRNA 扩增子测序, 探究摄食不同饵料时期加州鲈仔稚鱼肠道微生物的物种多样性和相对丰度差异。结果分析表明, 各时期肠道微生物 Goods_coverage 均为 1, 表明测序结果可反映肠道真实存在的微生物。饵料转换显著影响加州鲈仔稚鱼肠道微生物多样性, 转饵期(CP1、CP2)肠道微生物种类变化显著, 结构组成呈单一化, 而摄食活饵和完全配合饲料时期微生物均匀度分布较高。其中, FP 阶段微生物物种最丰富、结构最复杂, 属水平菌群相对丰度高于 1% 的菌群平均达 16 种, LP 期平均有 8 种, 而 CP1、CP2 两时期均不超过 2 种。假单胞菌属(*Pseudomonas*)平均相对丰度 CP1、CP2 两时期分别为 93.27%、97.33%, 占绝对优势, 摄食不同饵料时期优势菌相对丰度存在显著差异, 表明加州鲈仔稚鱼转饵对肠道相关功能的微生物产生显著影响, 这可能是肠道对成分复杂的饵料吸收利用的响应。探究转饵成功的加州鲈仔稚鱼肠道微生物多样性组成, 为加州鲈转饵驯化的机制研究提供了基础资料, 也为从肠道微生态调控来改善或优化加州鲈转饵技术提供新视角。

关键词: 加州鲈; 仔稚鱼; 转饵; 肠道微生物; 多样性

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)07-0794-16

加州鲈(*Micropterus salmoides*)学名大口黑鲈, 原产于北美洲。因无肌间刺, 营养丰富且上市时间快, 市场需求量大, 加州鲈成为国内目前非常具有潜力的水产养殖品种, 中国加州鲈养殖产量占全球养殖总产量的 99% 以上^[1], 深受消费者和养殖户青睐。近年来, 中国南、北方均有养殖, 2022 年加州鲈总产值为 80.2 万 t, 广东、江苏、浙江及湖南是主养大省, 其中广东省占比近 5 成^[2]。加州鲈是以肉食性为主的杂食性鱼类, 经摄食驯化后, 也可投喂人工配合饲料, 而加州鲈转食驯化期间面临死亡率高、病害频发的问题^[1], 这与鳊

(*Siniperca chuatsi*)转食后出现的症状类似^[3]。其中, 拖便和肠炎病是造成鱼类转食期间大量死亡的常见诱因, 这可能是由于饵料的变化引起免疫机能下降^[3]、肠道微生态环境失调导致患病死亡^[4-5]。动物肠道微生物在其疾病发生和健康平衡中具有重要作用, 研究发现饵料变化会影响鱼类肠道微生物物种多样性^[6-8]。

动物肠道微生物组被称为“遗忘的内源器官”, 参与营养吸收、抵御疾病及促生长发育等生命活动, 鱼类中也不例外^[9]。鱼类肠道微生物种类组成复杂, 随自身生长阶段、食性和生境的变化结构

收稿日期: 2024-3-26; **修订日期:** 2024-5-20.

基金项目: 湖南省水产种业(鲈鱼)(2021-2024)项目; 国家特色淡水鱼产业技术体系长沙综合试验站项目(CARS-46).

作者简介: 田璐(1991-), 男, 助理研究员, 从事鱼类遗传育种研究工作. E-mail: tl8cset@163.com

通信作者: 肖光明, 研究员, 从事渔业基础、应用研究及推广示范工作. E-mail: Xgm8888265@126.com

和组成发生变化^[10-13]。研究发现动物食物变化会影响其肠道微生物多样性, 如取食不同食物的小菜蛾(*Plutella xylostella*)^[14]、摄食季节性变化食物的长臂猿(*Hoolock tianxing*)^[15]、断奶前后仔猪^[16]肠道微生物发生变化。动物的行为也与肠道微生物密切相关, 如小鼠(*Mus musculus*)^[17]的进食活动、蜜蜂(*Apis mellifera*)^[18]的采蜜强度、杜洛克猪(*Duroc pig*)^[19]的采食行为也受到肠道微生物的影响。鱼类中发现在摄食活饵与配合饲料的转换过程中, 鳊^[20]、牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)^[21]及团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[22]肠道微生物存在差异, 转食转饵会影响宿主肠道菌群微生态平衡。通过在鱼类饲料中添加益生菌^[23-24]、中草药^[25]可改善肠道微生态环境。加州鲈仔稚鱼有摄食动物性活饵的习性, 由投喂活饵到死饵、肉食性转化为人工配合饲料的转食过程中都需人工驯食。Yu 等^[1]研究表明, 目前加州鲈仔稚鱼驯食期间苗种存活率还具有很大的提高空间。加州鲈鱼苗全长 2~3 cm 时可开始驯食人工配合饲料^[26], 而转饵驯食期间规格大小、养殖密度及投喂方法均影响加州鲈驯食成功率和存活率^[27-28]。转饵阶段, 由于肠道不适应产生应激引发肠道炎症等也可能影响鱼苗在驯化过程中存活率。目前, 尚未见到对加州鲈早期仔稚鱼转饵期间肠道微生物变化的报道, 相关研究主要涉及加州鲈转食期间消化系统发育^[29]、亚成体或成体肠道微生物的研究^[30]。加州鲈肠道健康相关的研究主要涉及到饲料蛋白源替代和饲料添加剂等问题, 而肠道微生物的变化是肠道健康的重要关注点。加州鲈饲料驯化已取得较好的进展, 已培育了易驯食的新品种优鲈 1 号、3 号^[26], 而成功转食的加州鲈肠道微生物如何演替尚未见报道。推测成功转食的加州鲈肠道可能存在潜在的有益微生物, 促进肠道对食物变化的适应与吸收利用。本研究分别采集摄食生物饵料、活饵+配合饲料粉料的混料及完全配合饲料的加州鲈后肠肠道内容物, 采用 16S rDNA 扩增子测序, 获得转饵期间及转饵前后加州鲈肠道微生物物种多样性和相对丰度变化, 研究加州鲈仔稚鱼肠道微生物, 对从肠道微生态调视角提高加州鲈转饵期间存活率及揭示加州鲈人工饲料驯化

机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验设置

实验用加州鲈(*Micropterus salmoides*)为湖南省常德市鲈鱼良种场室内帆布池培育, 全程曝气, 平均水温 21 °C, 本地孵化。实验用鱼均为同批次培育, 经开口、驯食, 不同生长阶段鱼苗生长良好, 摄食正常。所有实验均在 1 m³ 帆布桶进行, 实验共分为 4 期, 即生物饵料时期(live-bait period, LP), 第 1 个转饵期(1st conversion diet period, CP1), 第 2 个转饵期(2nd conversion diet period, CP2), 完全配合饲料时期(feeding period, FP)。加州鲈出膜第 2 日(2 日龄, 2 d)投喂刚孵化的丰年虫以开口驯食, 10 日龄再补投喂桡足类、红虫等生物饵料, 15 日龄投喂红虫与粉料混合料, 开始逐步转食。第 1 个转饵期(CP1, 15~19 d)混少量粉料投喂(红虫与粉料质量比例 7 : 3), 第 2 个转饵期(20~24 d)增加粉料质量比例(红虫与粉料质量比 3 : 7), 25 日龄停止生物饵料的投喂。驯食期间实行少量多次原则, 每日投饵 3~6 次, 每次持续 5 min, 粉料为鲈鱼专用配合饲料, 日投喂量根据摄食情况调整, 不抢食后少投至停止投喂。由于加州鲈仔苗具有趋光现象, 在傍晚投食前加灯光辅助驯食。完全转食后, 投喂小破碎料、大破碎料逐步过渡到颗粒饲料。饵料投喂前均进行无菌化处理。每个实验组设置 3 个重复。LP 每桶 1000 尾, CP1、CP2 每桶 500 尾, FP 每桶 50 尾。实验设计示意图如图 1a 所示。

1.2 样品采集

实验持续 60 d, 13 日龄采集样品, 记为 LP 期; 19 日龄采集样品, 记为 CP1 期; 24 日龄采集样品, 记为 CP2 期; 46 日龄采集样品, 记为 FP 期; 每一期每桶随机取 20 尾鱼, 测量体重体长、解剖, 分别取后肠肠道内容物, 合并为一个混合样, 各时期均为 3 重复。将不同日龄时期加州鲈后肠肠道内容物置于 1 mL 无菌冻存管中, 液氮速冻后, 于 -80 °C 冰箱保存待用。

1.3 肠道微生物 DNA 提取

选择 CTAB 法对不同时期加州鲈肠道内容物

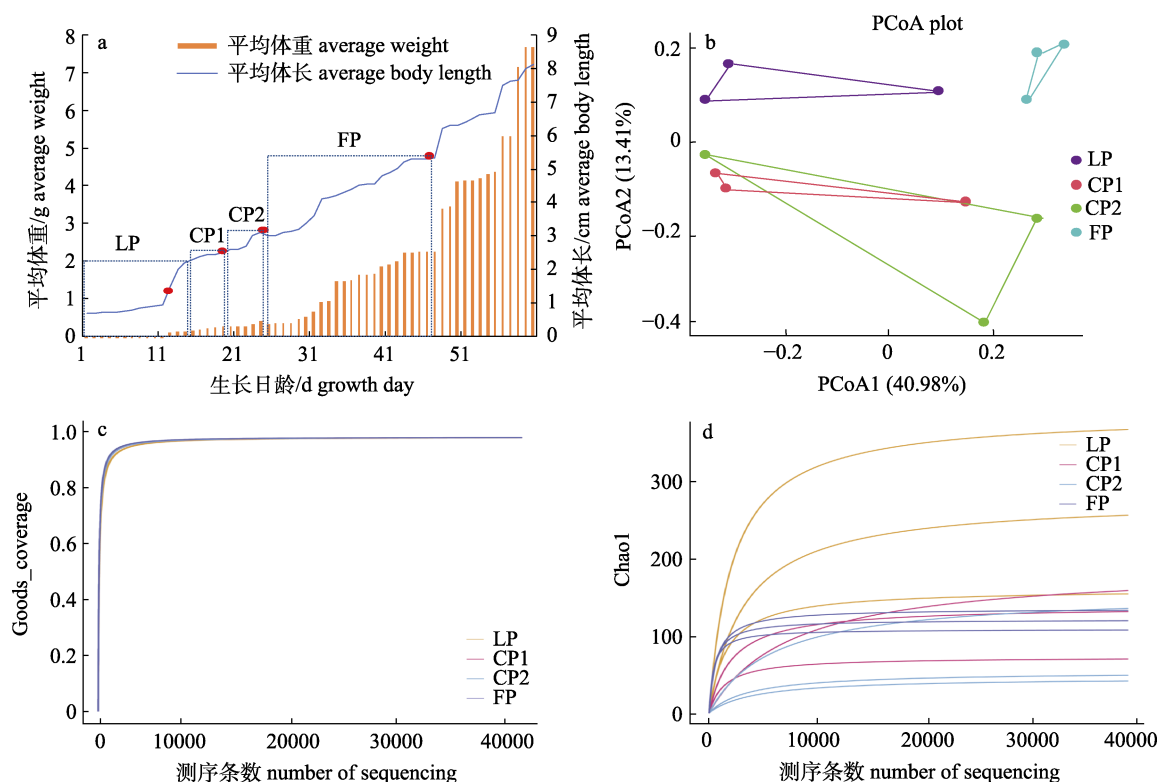


图 1 实验设计示意图和测序结果分析

a. 橙色条形图代表“平均体重”，蓝色折线图代表“平均体长”。1–14 日龄为 LP (live-bait period, 生物饵料期); 15–19 日龄为 CP1 (1st conversion diet period, 转饵期 1); 20–24 日龄为 CP2 (2nd conversion diet period, 转饵期 2); 25–46 日龄为 FP (feeding period, 人工配合饲料期)。第 13、19、24 及 46 日龄处红圆点为采样时间点。b. 基于 Unweighted_unifrac 距离矩阵的样品间主坐标 PCoA 分析。c. 不同样品微生物覆盖率 Goods_coverage 分析。d. 样品间稀释曲线 Chao1 评估分析。

Fig. 1 Experimental design and analysis of sequencing results

a. The orange bar chart represents “average body weight”, and the blue line chart represents “average body length”. LP (live-bait period): 1–15 days after hatching; CP1 (1st conversion diet period): 16–19 days after hatching; CP2 (2nd conversion diet period): 20–24 days after hatching; FP (feeding period): 25–46 days after hatching. The red dots at 13, 19, 24, and 46 days after hatching represent time points at which sampling occurred. b. Principal coordinate PCoA analysis between samples based on unweighted unifrac distance matrix. c. Goods_coverage analysis of microbial coverage in different samples. d. Rarefaction curves and estimators of different samples.

样本进行微生物组总 DNA 的提取, 并通过 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 同时采用紫外分光光度计对 DNA 进行定量。

1.4 PCR 扩增及测序

选取 16S rDNA V3~V4 可变区通用引物 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'), 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')进行 PCR 扩增, PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳确证。PCR 产物由 AMPure XP beads (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, USA)纯化, Qubit (Invitrogen, USA)定量。对纯化后的 PCR 产物使用 Agilent 2100 生物分析仪 (Agilent, 美国) 和 Illumina (Kapa

Biosciences, Woburn, MA, USA)文库定量试剂盒进行评估, 将合格的文库梯度稀释后, 根据所需测序量按相应比例混合, 单链变性后上机测序。使用 NovaSeq 6000 测序仪进行 2×250 bp 的双端测序, 相应试剂为 NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (500 cycles)。

1.5 数据处理

对测序获得的双端数据, 首先需要根据 Barcode 信息对样品进行数据拆分, 并去除接头和 Barcode 序列, 通过 Cutadapt (v1.9)去除 RawData 的引物序列和平衡碱基序列。采用 fqtrim (v0.94)和 FLASH (v1.2.8)软件对测序 reads 进行数据筛选。

Vsearch (v2.3.4) 软件去除嵌合体序列。通过 DADA2 进行长度过滤和去噪。根据 100% 序列相似度对所有测序序列进行聚类, 进而获得单碱基精度的代表序列, 基于得到的特征序列 amplicon sequence variants (ASVs) 相对丰度值进行 α 及 β 多样性分析。其中 α 多样性分析主要通过 Observed_ OTUs、Shannon、Simpson、Chao1、Goods_coverage、Pielou_e 六大指数对各样品多样性进行评估。 β 多样主要通过计算 4 种距离(Weighted_unifrac、Unweighted_unifrac、Jaccard、Bray_curtis)对各样本、组间的多样性进行评估分析。对测序序列采用 SILVA 及 NT-16S 数据库(Release 138, <https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>)进行物种注释, 按照门、纲、目、科、属、种物种分类, 然后使用 ASVs 相对丰度值对各物种在各样本中的丰度进行统计。基于得到的物种丰度统计信息, 运用 SPSS 22.0 软件进行 Kruskal-Wallis test 分析, 比较各组之间平均相对丰度和多样性的显著性差异($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 测序结果分析

通过对代表摄食不同饵料时期的加州鲈仔稚鱼(LP、CP1、CP2 及 FP)肠道微生物进行高通量测序发现, 有效数据中数据质量 $\geq Q20$ 的占比高(几乎均高于 95%), 说明测序可信度高(表 1)。组

内样本聚在一起, 意味着生物学重复性好, 而组间分别分布在相应区域, 组间样品具有区分度, 分散聚类。CP1、CP2 两时期有相互交叉现象, 这与加州鲈的规格相当和生长时期最近相关, 这与实验实际相符(图 1b)。Goods_coverage 是指微生物覆盖率, 其数值越高, 则样本中新物种未被检测到的概率越低, 本次测序该指标值均达到 1, 这意味着本次测序深度足够(图 1c); 稀释曲线(Chao1)可直接反映测序数据量的合理性, 并间接反映样品中物种的丰富程度, 本次测序结果稀释曲线趋向平坦, 如图 1d 所示, 说明测序数据量渐进合理, 增加重复样本也不会产生新的微生物, 即本次肠道微生物数据结果能较好反映真实情况。

2.2 加州鲈仔稚鱼肠道微生物分布特征

加州鲈仔稚鱼肠道微生物 16S rDNA 文库测序共获得 1143320 条 reads 原始序列, 经过优化后共 994144 条有效 reads 序列, 各时期有效序列比均不存在显著性差异(表 1)。LP 期平均检测到 262 个 ASVs, 显著高于 CP2 时期($P<0.05$); CP1、FP 期平均检测到 120 个 ASVs, 而 CP2 期检测到 76 个 ASVs, 数目最低, 即 CP2 时期加州鲈肠道微生物种类最少(表 1)。根据加州鲈仔稚鱼肠道微生物序列注释结果发现, 门水平上较高相对丰度的有 5 种微生物, 即变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteriota)、厚壁菌门(Firmicutes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota),

表 1 不同饵料时期加州鲈仔稚鱼肠道内容物高通量测序有效数据统计分析
Tab. 1 Statistical analysis of high-throughput sequencing data on intestinal contents of the juvenile *Micropterus salmoides* at different feeding stages

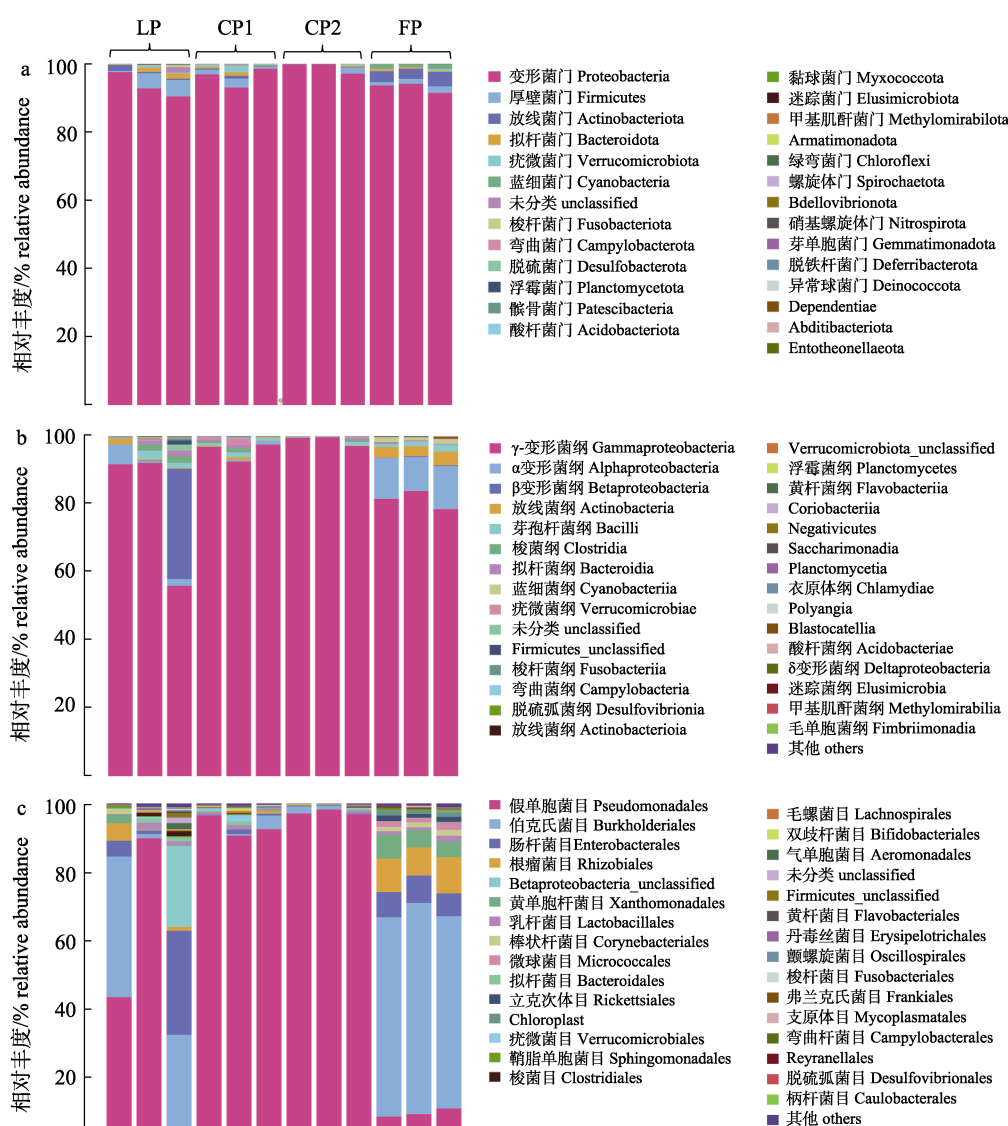
时期 period	原始数据 raw_tags	有效序列比/% valid rate	Q20/%	Q30/%	GC/%	特征序列数 ASVs
生物饵料期 live-bait period, LP	96491±7696	80.59±2.37	95.00±1.24 ^{ab}	88.16±2.41 ^{ab}	52.33±0.74 ^{ab}	262±63 ^a
第 1 个转饵期 1 st conversion diet period, CP1	85165±2015	85.31±7.04	90.99±2.31 ^a	80.31±4.01 ^a	51.98±0.53 ^{ab}	120±27 ^{ab}
第 2 个转饵期 2 nd conversion diet period, CP2	85445±193	91.66±1.52	95.33±0.13 ^{ab}	87.82±0.32 ^{ab}	50.93±0.05 ^a	76±31 ^b
配合饲料时期 feeding period, FP	84794±1569	89.49±0.07	96.96±0.28 ^b	91.53±0.75 ^b	53.29±0.01 ^b	120±29 ^{ab}

注: 同列数据上标不同字母表示不同时期存在显著差异($P<0.05$)。Q20(30)%表示有效数据中一个碱基的正确率 ≥ 99 (99.9)%的数据比例。GC%表示有效数据中数据 GC 含量。
Note: The different superscripts in the same column of data indicate significant differences in different periods ($P<0.05$). Q20 (30)% indicates the proportion of valid data with an accuracy rate of one base ≥ 99 (99.9)%. GC% indicates GC content in valid data.

FP 期这 5 种菌分别占比 82.47%、9.19%、4.95%、2.29%、0.58%，物种分布均匀度高，而转饵期物种组成单一化尤为明显，变形菌门最高，其中 CP2 期这一特征最为明显，Top1 的变形菌门 (Proteobacteria) 占绝对优势 (98.94%)，在纲、目、科、属、种水平，组成也类似 (图 2b, c, d, e, f)。其中，在属的水平，假单胞菌属 (*Pseudomonas*) CP1 期占比 93.27%，CP2 期占比 97.33%，即高丰富度微生物占绝对优势，分布呈单一化特征 (图 2e)；FP 期，Top10 属水平微生物平均相对丰度多数占 1%~5%，最多不超过 36%，LP 期组成也有类似特点，即微生物分布物种均匀度高。不同时期均存

在极高相对丰度的变形菌门 (Proteobacteria)、 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)。CP1、CP2 转饵期除种水平之外的其他分类水平都具有相同的最高相对丰度肠道微生物，即均为假单胞菌。

α 多样性指数分析显示，Chao1、Observed species_OTUs、Shannon、Simpson 和 Pielou-e 指数，转饵阶段 CP1 期、CP2 期均低于 LP 期和 FP 期 (图 3)，而 Goods_coverage 指数所有时期均为 1，均无显著性差异，即所有时期的肠道微生物均被检测到。随着日龄增长，除了覆盖率指数 (Goods_coverage) 之外，其他 α 指数多样性均先下降后上升，且在 CP2 下降到最低谷，下降程度与 LP 期均



(待续 to be continued)

(续图 2 Fig. 2 continued)

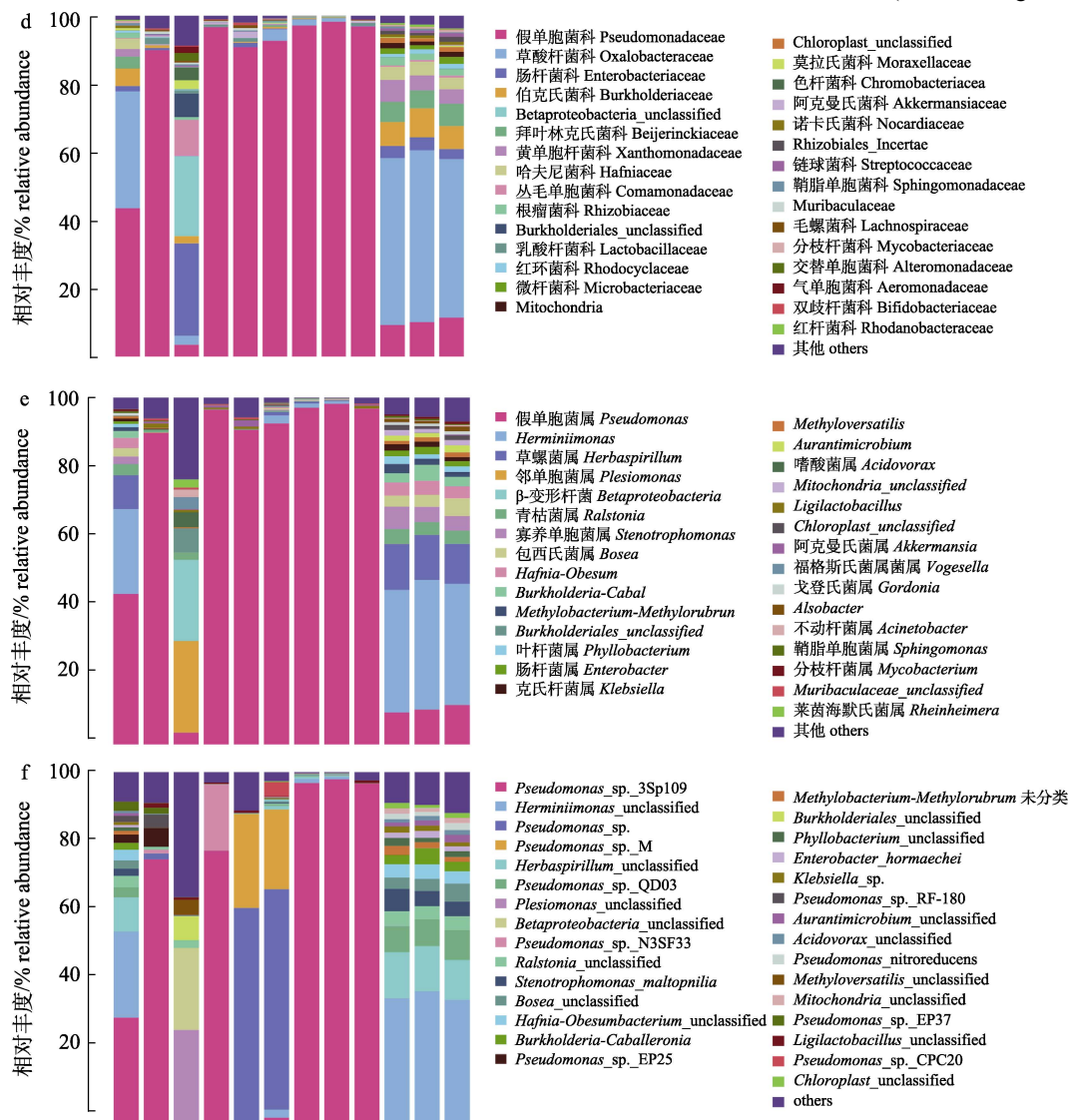


图 2 加州鲈不同饵料时期各分类水平肠道微生物相对丰度分布

a. 门水平; b. 纲水平; c. 目水平; d. 科水平; e. 属水平; f. 种水平.

Fig. 2 Relative abundance of intestinal microbiota across taxonomic ranks for different feeding periods of *Micropterus salmoides*

a. Phylum level; b. Class level; c. Order level; d. Family level; e. Genus level; f. Species level.

存在显著性差异($P < 0.05$)。随后各组 α 多样性均上升, Simpson、Shannon 及 Pielou-e 指数升高显著(图 3)。加州鲈转饵阶段其肠道细菌 α 多样性各指数间变化趋势几乎一致, 转饵期间 α 多样性均降低, 表明加州鲈改食配合饲料后, 通过改变肠道微生物多样性加以响应。比较 CP1 与 CP2 两时期, 结果发现 α 多样性各指数 CP1 均高于 CP2, 且 Simpson 指数具有显著性差异($P < 0.05$, 图 3)。CP2 期肠道细菌 α 多样性最低, 而饵料转食前后(LP、

FP)作为稳定营养来源, 肠道细菌多样性和平均相对丰度相较于转饵期高, LP 期与 FP 期 α 多样性均无显著性差异。

根据 Bray-Curtis 距离聚类分析, 在门水平 LP 与 CP1、CP2 与 FP 分别先靠近, 再整体聚类(图 4a); 在纲、目水平, 是按 LP、CP1、CP2 及 FP 顺序依次聚类(图 4b、4c); 在科、属及种水平的均是 CP2 与 CP1、LP 与 FP 分支最近, 分别先聚类, 然后再聚在一起(图 4d、4e)。在属水平丰度

高于 1% 的菌群 FP 期平均有 16 种, LP 期平均只有 8 种, 而 CP2 期、CP1 期两组均不超过 2 种。FP 期内相对丰度最高的属 *Herminiimonas*, 占比不超过 27%, LP 期内相对丰度最高的属 *Pseudomonas*, 平均占比最高不超过 46%, 而 CP1 期、CP2 期假

单胞菌属丰度分别占比所有细菌的 93.27%、97.33%, 其他微生物种类比例极小, 转饵期加州鲈微生物菌群组成结构单一, 上述聚类分析结果与 α 多样性分析一致。FP 期、LP 期微生物分布均匀度高于 CP1 期、CP2 期, 微生物物种丰富度

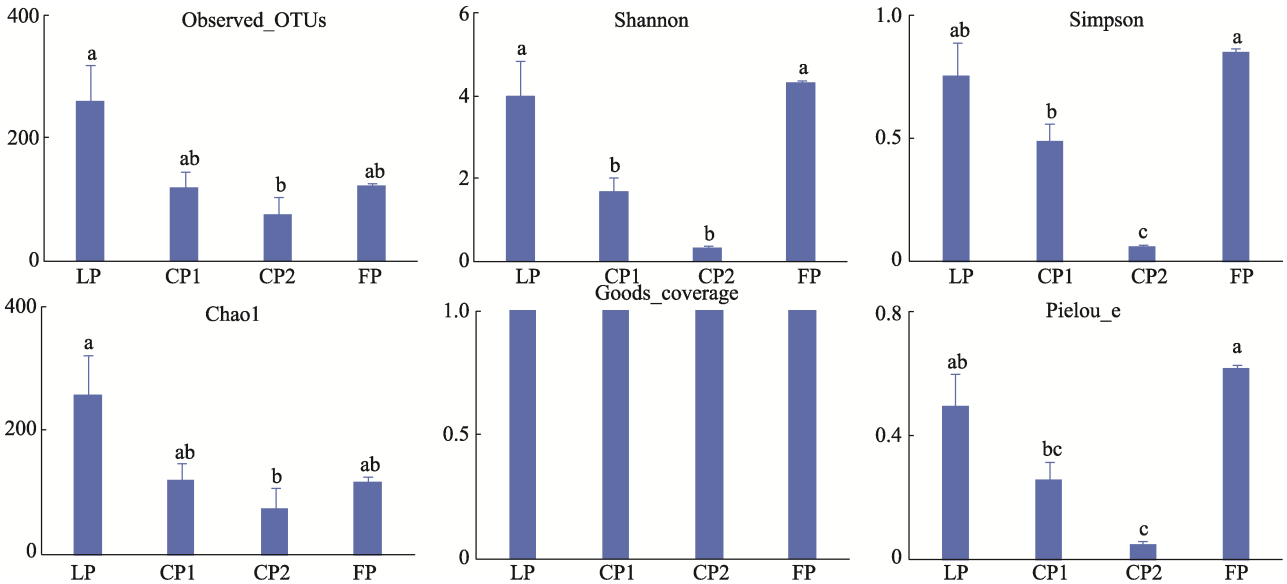
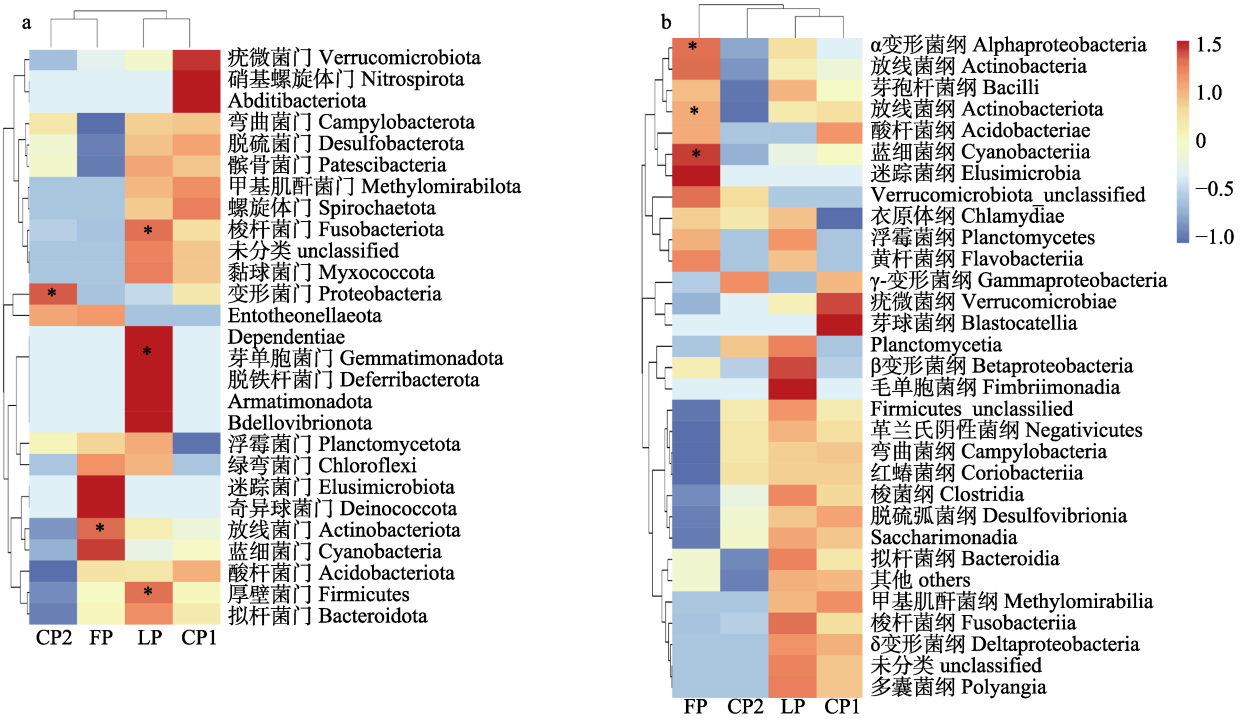


图 3 加州鲈仔稚鱼肠道微生物 α 多样性指数差异分析
柱形图上方不同字母表示差异显著($P<0.05$).

Fig. 3 Difference in the α diversities of intestinal microbiota in juvenile *Micropterus salmoides*
Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$).



(待续 to be continued)

(续图 4 Fig. 4 continued)

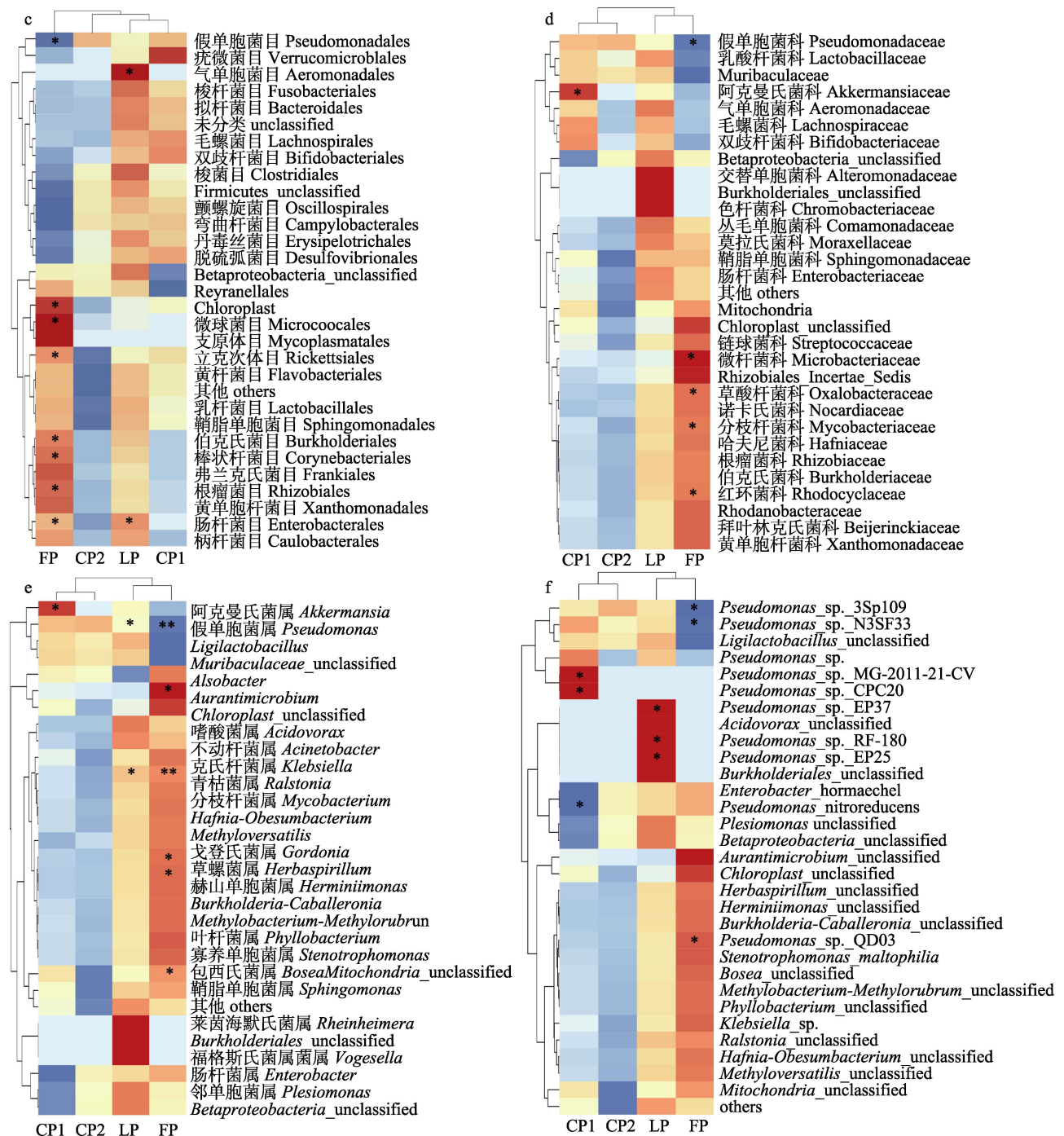


图 4 加州鲈仔稚鱼肠道微生物各分类水平 top30 的热图。

左侧或上侧是 Bray-Curtis 距离聚类树结构, 样品聚类越近, 分支越短, 代表样品/分组物种组成越相似。右侧的是各样品/分组在不同分类水平上的物种相对丰度分布热图。根据图例, 越接近橘红色数值越大, 表示相对丰度越高; 反之, 相对丰度越低。a. 门水平; b. 纲水平; c. 目水平; d. 科水平; e. 属水平; f. 种水平。6 个分类水平图中, 各图中标有*的行中, *数量不同代表具有显著性差异。

Fig. 4 Heat map of the top30 species intestinal microbiota of the juvenile *Micropterus salmoides* at different taxonomic ranks. On the left or upper side is the Bray-Curtis distance clustering tree. The closer the sample cluster, the shorter the branch, indicating a more similar species composition in the sample/group. On the right side is the relative abundance distribution heat map of each sample/group at different taxonomic levels. According to the legend, the closer the sample/group is to orange, the higher relative abundance, and vice versa, the lower relative abundance. a. Phylum level; b. Class level; c. Order level; d. Family level; e. Genus level; f. Species level. In the 6 classification level graphs, the rows marked with * in each graph represent significant differences with different numbers of *.

高,多种菌群间存在竞争,以保持相对动态平衡状态,稳定性更高。CP1、CP2 期以高相对丰度微生物为主导,结构组成单一化。

2.3 加州鲈仔稚鱼转饵前后肠道微生物变化

加州鲈仔稚鱼在转食过程中,门、纲、目、科、属、种各水平均存在显著升高或降低的肠道微生物,梭杆菌门(*Fusobacteriota*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadota*)在转饵前的 LP 期最高。放线菌门(*Actinobacteriota*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*) 在转饵后的 FP 期中占绝对优势,而变形菌门 *Proteobacteria* 相对丰度显著下降。在纲水平上,所有时期优势菌纲均为 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*),平均占 83%,其中转饵后的 FP 期相对丰度最高。随着加州鲈的生长,人工配合饲料的摄入,FP 时期微生物物种多样性和相对丰度呈升高的趋势,如 α 变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、放线菌纲(*Actinobacteria*)、蓝细菌纲(*Cyanobacteriia*)纲相对丰度显著升高。目水平,除了转饵阶段(CP1、CP2)之外,微生物各物种均匀度高,*Pseudomonadales* 目随日龄增长先升高,于第二个转饵期 CP2 期相对丰度升至最高,后逐渐下降,在 FP 期相对丰度降到极低水平($P<0.05$)。转饵后伯克氏菌目(*Burkholderiales*)、肠杆菌目(*Enterobacterales*)、根瘤菌目(*Rhizobiales*)、微球菌目(*Micrococcales*)、立克次体目(*Rickettsiales*)、*Chloroplast*、棒状杆菌目(*Corynebacteriales*)平均相对丰度显著升高。在科、属、种水平,相对丰度较高的微生物在转饵前后时期多样性明显有所变化,FP 期肠道微生物物种多样性最高。科水平,不同于其他时期以 *Pseudomonadaceae* 科相对丰度较高,转饵后的 FP 期 *Oxalobacteraceae* 科、分枝杆菌科(*Mycobacteriaceae*)、红环菌科(*Rhodocyclaceae*)、微杆菌科 *Microbacteriaceae* 显著升高。在属水平,转饵阶段假单胞菌属(*Pseudomonas*)、阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)相对丰度显著升高($P<0.05$),而转饵后赫山单胞菌属 *Herminiimonas*、青枯菌属(*Ralstonia*)、微杆菌属(*Aurantimicrobium*)、包西氏菌属(*Bosea*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)相对丰度高于转饵前和转饵阶段($P<0.05$,图 4e)。在属、种水平上,FP、LP 期微生物物种多样性均较高,与

CP1、CP2 组成差异明显,较多微生物相对丰度显著高于转饵期,而假单胞菌属(*Pseudomonas*)及 *Pseudomonas_koreensis* 在转饵后的 FP 期急剧减少至相对丰度极低水平($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 加州鲈仔稚鱼肠道微生物组成分析

动物肠道微生物作为机体的“第二套基因组”,因此其组成在一定时期相对稳定^[31-33]。本研究发现加州鲈仔稚鱼转饵前期(LP)、转饵期(CP1、CP2)及后期(FP)肠道微生物组成生物学重复好,即各生长时期肠道微生物相对稳定。已有研究发现不同食性鱼类肠道存在核心菌群,这些微生物在益生菌或自身变异性功能的作用下,能在宿主肠道中稳定存在^[33-34]。从成功转饵的加州鲈仔稚鱼肠道微生物六大分类水平分布结果发现,核心菌群与 Sheng 等^[35]研究结果类似。假单胞菌群以动态变化形式存在不同饵料时期的加州鲈仔稚鱼肠道内,而以极高的平均相对丰度水平出现在两转饵期(CP1、CP2)阶段,意味着假单胞菌可能参与了加州鲈适应转饵的过程。有研究发现,动物肠道微生物相对丰度处于动态变化,能够调节宿主生长发育和健康维持^[36-37]。基于这种动态变化的规律,在肠道微生物研究中常关注门和属水平的微生物结构组成。如 FP 期假单胞菌属显著降低到极低相对丰度,代表了这种变化趋势,再关注种水平变化就无代表意义且种分类水平精确度不高,因此在扩增子测序中不重点关注种水平微生物。基于 Bray-Curtis 距离聚类分析表明,从门水平发现,LP 与 CP1、CP2 与 FP 因组成更相似而首先聚类,而加州鲈随 LP、CP1、CP2 至 FP 体重逐渐增加,这表明肠道微生物组成可能与加州鲈的生长阶段有关;属水平 CP1 与 CP2、LP 与 FP 首先聚类,各分支靠近,然后所有时期再聚类,CP1 与 CP2 同为转饵阶段,意味着从属水平角度,两转饵阶段肠道微生物的组成更加相似。绝大多数鱼类开口饵料为轮虫、无节幼虫和小型枝角类等,食性类似,随着生长发育,食性逐渐过渡到与成鱼食性一致,即大多数鱼类需经历转饵阶段。有研究通过饵料驯化调节人工放流前的长江鲟肠道微生

物组成, 改善了放流后的存活率^[38]。郝耀彤等^[39]研究发现食物的改变对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肠道菌群产生快速而显著的变化。野生茎柔鱼 (*Dosidicus gigas*) 的肠道微生物在食物来源不稳定的季节, 肠道微生物菌群种类变化不显著, 但相对丰度差异显著^[40]。鱼类食物因季节性的变化, 其肠道微生物也出现季节性变化^[41]。本研究发现加州鲈在摄食生物饵料或完全人工配合饲料时期, 肠道微生物多样性均较高, 结构更加稳定, 而转饵期肠道微生物多样性较低, 假单胞菌、阿克曼氏菌科或属分类水平中占绝对优势, 具有组成单一化现象, 说明转饵过程会影响加州鲈肠道菌群组成。生物机体肠道栖息大量微生物, 最终能够维持动态平衡, 与微生物之间相互制约密切相关^[42-43]。动物健康状态下致病性微生物在多数益生菌微生物的竞争之中不会占据绝对优势, 在宿主免疫系统的保护下只能维持较低的相对丰度。当单一的肠道微生物大量繁殖时, 可能菌群失调, 影响机体健康^[44-45], 这可能是加州鲈仔稚鱼从摄食生物饵料到人工配合饲料转饵过程中高死亡率的原因之一。

本研究中转饵前后与转饵期间肠道微生物组成存在显著性差异。LP 时期仔鱼肠道正处于发育期, 口裂小, 只能以刚孵化的活饵为食, 饵料成分相对稳定, 肠道微生物物种多样性和均匀度相对较高。随着加州鲈生长, 肠道微生物也会变化。已有研究表明加州鲈逐渐生长发育, 肠道结构进一步完善, 其肠道微生物存在显著变化^[29,46]。从 LP 期到 FP 期, 加州鲈肠道微生物物种多样性显著升高, 可能是随着个体生长, 肠道黏膜增加、肠黏膜褶增高, 各项器官发育逐渐完善。黏膜作为共生细菌的主要栖息地, 会使更多的肠道微生物得以黏附^[47]。随着鱼类生长, 食量提升, 肠道长度增加, 食物滞留时间随之延长, 可能需要更多微生物参与营养物质的吸收利用^[33,48]。

3.2 转饵阶段肠道微生物差异分析

转饵期间(CP1、CP2) α 多样性指数中 Chao1、Observed_OTUs、Shannon、Simpson 和 Pielou-e 指数均低于 LP 期和 FP 期, 这是加州鲈肠道微生物

对转饵过渡的适应。本研究比较了转饵的两阶段 CP1 (生物饵料质量占比近 70%)、CP2 (人工配合饲料质量占比超 70%), 结果发现 α 多样性各指数 CP1 均高于 CP2, 这意味着人工配合饲料至少是引起仔稚鱼的肠道微生物多样性和相对丰度变化的因素之一。大量研究表明食物营养成分的变化影响鱼类肠道微生态环境^[49-51]。患病个体相对于健康个体, 肠道微生物多样性降低^[52]。因此, 转饵后期(CP2)微生物多样性降到最低, 可能是由于摄入人工饲料后, 肠道组织受到应激损伤, 导致加州鲈转饵阶段肠道微生态环境的失调, 这可能是很多鱼类饲料驯化研究面临的难题^[53]。鱼类在生活史早期阶段, 因鱼苗口小, 咽喉齿、鳃耙未发育, 肠管短而缺乏相关消化酶, 鱼苗只能以适口的小型浮游动物或浮游藻类等开口, 逐步过渡到摄食人工配合饲料。刘增新等^[21]研究发现摄食轮虫或卤虫与摄食饲料的牙鲆, 其肠道微生物具有显著性差异, 这一方面与活饵自身携带微生物有关; 另一方面与牙鲆吸收、消化活饵的消化系统发育特征有关。因此, 在育苗生产中, 活饵通常需要用适当浓度聚维酮碘消毒, 降低对肠道的副作用, 从而提高存活率。Chen 等^[3]研究了 3 种益生菌均能提高驯饵鳊的存活率和对颗粒饲料的采食率以及改善鳊消化系统。因此, 在加州鲈转饵阶段辅以适宜的益生菌或益生元, 对提高肠道微生物物种多样性、平稳度过转饵期具有重要意义, 从肠道微生态调控角度改善或优化加州鲈转饵技术将会是很具潜力的研究方向。本研究中, 加州鲈摄食活饵时期(LP)或人工粉料混合的转饵阶段(CP1、CP2)微生物物种多样性、平均相对丰度均不同于其他时期, 这可能是仔稚鱼随消化器官逐渐发育完善, 通过对益生菌的筛选作用, 从而重塑肠道微生态系统^[54]。宿主自主筛选作用决定肠道微生物的组成, 而这些微生物促进宿主肠道上皮细胞发育, 使得肠道系统得以完善, 又对益生菌的进一步筛选^[55]。随着 FP 期加州鲈进一步生长发育, 对配合饲料逐步适应和成功转食, 促进消化吸收配合饲料的微生物的富集, 肠道微生态环境趋于稳定, FP 时期肠道微生物物种多样

性增加可能是这种良性循环的结果。

3.3 转饵对肠道相关功能微生物影响分析

肠道微生物对宿主发育具有调控作用。肠道微生物激活宿主相关通路,调节肠干细胞、肠黏膜、肠道毛细血管网等的发育,从而影响其对能量和营养物质的摄取与利用^[56]。本研究中变形菌门平均相对丰度各时期均最高,占比均在 80%以上,这一结果与李鸣霄等^[30]研究结论一致,该菌门具有多种代谢种类,适应能力强,是很多鱼类的核心菌群,如鲟(*Acipenser sturio*)^[57]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[58]等。研究发现,假单胞菌介导鱼类摄食能力增强和蛋白质吸收利用率的提高,有维持细胞稳态的作用,可能是鱼类能够饲料驯化的潜在机制^[59]。本研究中 CP1、CP2 转饵时期假单胞菌群相对丰度组显著高于 FP、LP 期,表明假单胞菌群参与了加州鲈转饵转食的过程。Korkea 等^[60]发现假单胞菌群具有预防虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)鱼苗综合征(RTFS)感染的作用。加州鲈 LP 时期拟杆菌门相对丰度最高。拟杆菌门与高脂肪和蛋白质的摄入量有关^[61],其有助于对活饵的消化吸收。而摄食配合饲料 FP 时期放线菌门相对丰度显著高于其他组。放线菌具有降解几丁质、木质素和纤维素等复杂聚合物的作用,在有机物质的周转和碳循环等分解中发挥重要作用^[62],这可能有利于加州鲈肠道对成分复杂的人工配合饲料吸收利用。厚壁菌门的许多成员都是有益菌,可上调宿主肠上皮细胞葡萄糖转运蛋白的表达,促进机体对葡萄糖的摄取,同时还具有抑制病原菌、增强机体免疫的作用^[63]。LP 期乳杆菌相对丰度高于 FP 期,这可能与加州鲈仔鱼摄食富含碳水化合物化合物的生物饵料红虫有关。在育苗生产中,红虫常作为仔稚鱼转食阶段的饵料生物,可易被仔稚鱼吸收利用。在鱼类仔稚鱼早期使用益生菌干扰,能明显提高存活率,如大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[64]、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[65]。罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)具有促进罗非鱼生长的作用,LP、CP1 期显著高于其他两时期,说明在加州鲈仔稚鱼发育早期阶段各项机能不完善时,肠道存在一定功能的微生物辅助消化,使肠道微

维持生态平衡^[11]。*Akkermansia* 属与宿主代谢紊乱呈负相关,这种细菌的富集与代谢参数的改善是一致的^[66],这可能也是另外一种利于加州鲈转饵的微生物。乳酸杆菌、双歧杆菌等益生菌可抑制致病菌预防肠道炎症、提高有益细菌的活性和消化酶的分泌,促进鱼类发育早期阶段肠道消化吸收^[67]。鱼类肠道中拟杆菌门与厚壁菌门的比值影响宿主的脂肪代谢^[68]。摄食混合饵料组中拟杆菌门与厚壁菌门的比值低于 LP、FP 时期,这意味着加州鲈适应转饵过程中,脂肪的积累受到一定影响。本研究与 Fan 等^[69]研究结果一致。因此,在鱼类快速生长阶段,保障饲料质量稳定及肠道微生态健康显得很有必要。在疾病与肠道微生物相关性研究中,发现有许多菌株被证实与疾病有关联,分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、支原体属(*Mycoplasma*)是鱼类等水生生物常见致病菌^[70],两者在 FP 期相对丰度最高,且具有显著性差异,这说明在加州鲈养殖生产中,随着个体增大患病风险也相应升高。鱼类肠道微生物组特有组成或变化,可无损伤性表征一些疾病^[71],如脱氯单胞菌属(*Dechloromonas*)、甲基暖菌属(*Methylocaldum*)、浮霉菌属(*Planctomyces*)、红杆菌属(*Rhodobacter*)、柄杆菌属(*Caulobacter*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*)相对丰度急剧升高,意味着草鱼患有肠炎^[72]。加州鲈转饵阶段相对丰度极高的假单胞菌群具有两面性,既是一类使加州鲈仔稚鱼适应转饵的益生菌,又是一类机会性致病菌^[73]。这就不难理解在一些研究中发现假单胞菌为鱼苗的有害菌。随着鱼类生长发育、个体逐渐成熟,肠道微生物多样性升高,一些致病菌也增多,如本研究中分枝杆菌属、支原体属多为致病菌,而肠道内的益生菌会分泌抑制有害微生物增殖的代谢产物,如短链不饱和脂肪酸(SCFAs)^[74]。随着加州鲈个体生长,在 FP 期较多相对丰度明显升高的益生菌,如 *Bosea*^[75]能够降氨氮、*Stenotrophomonas*^[76]能够分解几丁质。*Phylobacterium* 与细胞增殖有关联^[77]。有研究发现 *Phylobacterium* 是一种控制南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道弧菌的益生菌^[78]。*Herbaspirillum* 是一种与生长速率相关联的微生

物^[79]。随着虹鳟饲料中益生元 β -葡聚糖添加量增加, 其肠道中 *Aurantimicrobium* 相对丰度也相应增加^[80], 这些研究证实完成转饵的 FP 期存在益生菌促进加州鲈生长、代谢。这对维持健康的肠道微生态环境具有重要作用。综上所述, 了解加州鲈仔稚鱼肠道微生物物种多样性和相对丰度变化, 为后续转饵阶段进行微生态调控、益生菌添加剂介入的研究, 提高其人工驯食率、饲料转化率和鱼苗存活率等具有重要意义, 也为从肠道微生物视角揭示加州鲈仔稚鱼成功转饵的机制提供了重要基础资料。

参考文献:

- [1] Yu P F, Chen H, Liu M L, et al. Current status and application of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) germplasm resources[J]. Reproduction and Breeding, 2024, 4(2): 73-82.
- [2] Administrative Department for Fisheries the Ministry for Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook 2023[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023: 33. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 年中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 33.]
- [3] Chen X L, Yi H D, Liu S, et al. Probiotics improve eating disorders in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) induced by a pellet feed diet via stimulating immunity and regulating gut microbiota[J]. Microorganisms, 2021, 9(6): article No.1288.
- [4] Li T T, Long M, Ji C, et al. Alterations of the gut microbiome of largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) suffering from furunculosis[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): article No.30606.
- [5] Bozzi D, Rasmussen J A, Carøe C, et al. Salmon gut microbiota correlates with disease infection status: potential for monitoring health in farmed animals[J]. Animal Microbiome, 2021, 3(1): article No.30.
- [6] Zhong L, Xiang J G, Zeng D, et al. Effects of different diets on intestinal microbiota of *Elopichthys bambusa*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(4): 830-835. [钟蕾, 向建国, 曾丹, 等. 饵料对鳊肠道微生物多样性的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(4): 830-835.]
- [7] Sheng P C, Zhou D R, Han X R, et al. Effects of different feeding matters on intestinal microbial structure diversity of *Ophiocephalus argus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2020, 51(1): 148-155. [盛鹏程, 周冬仁, 韩新荣, 等. 不同饲养方式对乌鳊(*Ophiocephalus argus*)肠道微生物群落结构差异及种类多样性的影响[J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(1): 148-155.]
- [8] Ingerslev H C, von Gersdorff Jørgensen L, Lenz Strube M, et al. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type[J]. Aquaculture, 2014, 424-425: 24-34.
- [9] Nayak S K. Role of gastrointestinal microbiota in fish[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(11): 1553-1573.
- [10] Zhong L Q, Wang H X, Wang M H, et al. Different diets on growth performance and intestinal bacterial community of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(11): 1609-1617. [钟立强, 王海骁, 王明华, 等. 不同饵料对大口黑鲈生长性能和肠道微生物的影响[J]. 水生生物学报, 2022, 46(11): 1609-1617.]
- [11] Liu P, Li L X, Zheng W, et al. Differences in intestinal microbial community between dolly varden trout *Salvelinus malma* and lenok *Brachymystax lenok* with different ages[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2022, 37(4): 568-573. [柳鹏, 李玲雪, 郑伟, 等. 不同生长阶段花羔红点鲑和细鳞鲑肠道菌群结构差异分析[J]. 大连海洋大学学报, 2022, 37(4): 568-573.]
- [12] Bledsoe J W, Peterson B C, Swanson K S, et al. Ontogenetic characterization of the intestinal microbiota of channel catfish through 16S rRNA gene sequencing reveals insights on temporal shifts and the influence of environmental microbes[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166379.
- [13] Fan Y, Wang Y H, Ji G L, et al. Metagenomic sequencing reveals the intestinal microbial characteristics of *Hexagrammos otakii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 357-375. [樊英, 王友红, 姬广磊, 等. 基于宏基因组测序技术揭示大泷六线鱼肠道微生物特征[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 357-375.]
- [14] Wu X L, Xia X F, Chen J H, et al. Effects of different diets on the diversity of larval gut bacteria of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2019, 62(10): 1172-1185. [吴晓露, 夏晓峰, 陈俊晖, 等. 取食不同食物对小菜蛾幼虫肠道细菌多样性的影响[J]. 昆虫学报, 2019, 62(10): 1172-1185.]
- [15] Li Q, Fei H L, Luo Z H, et al. Gut microbiome responds compositionally and functionally to the seasonal diet variations in wild Gibbons[J]. NPJ Biofilms and Microbiomes, 2023, 9(1): article No.21.
- [16] Rist V T S, Eklund M, Bauer E, et al. Effect of feeding level on the composition of the intestinal microbiota in weaned piglets[J]. Journal of Animal Science, 2012, 90(Suppl 4): 19-21.
- [17] Ousey J, Boktor J C, Mazmanian S K. Gut microbiota

- suppress feeding induced by palatable foods[J]. *Current Biology*, 2023, 33(1): 147-157. e7.
- [18] Vernier C L, Nguyen L A, Gernat T, et al. Gut microbiota contribute to variations in honey bee foraging intensity[J]. *The ISME Journal*, 2024, 18(1): wrac030.
- [19] Jiang H, Yang H, Fang S M, et al. Identification of gut microbial taxa associated with feeding behaviors in pigs[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(1): 213-226. [姜辉, 杨慧, 方绍明, 等. 影响猪采食行为的肠道微生物种类鉴别[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(1): 213-226.]
- [20] Chen X, Sun C F, Dong J J, et al. Comparative analysis of the gut microbiota of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) feeding on compound diets and live baits[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 797420.
- [21] Liu Z X, Liu X Z, Shi B, et al. Composition of intestinal bacterial community of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) during early life stages[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 111-119. [刘增新, 柳学周, 史宝, 等. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)仔稚幼鱼肠道菌群结构比较分析[J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(1): 111-119.]
- [22] Wei J, Guo X W, Liu H, et al. The variation profile of intestinal microbiota in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) during feeding habit transition[J]. *BMC Microbiology*, 2018, 18(1): article No.99.
- [23] Zhu C Z, Li D, Chen W J, et al. Effects of dietary host-associated *Lactococcus lactis* on growth performance, disease resistance, intestinal morphology and intestinal microbiota of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 540: 736702.
- [24] Meng X L, Wu S K, Hu W P, et al. Clostridium butyricum improves immune responses and remodels the intestinal microbiota of common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735753.
- [25] Wu Z B, Gatesoupe F J, Li T T, et al. Significant improvement of intestinal microbiota of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) after traditional Chinese medicine feeding[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(3): 829-841.
- [26] Fan J J, Bai J J, Li S J, et al. Analysis on genetic diversity of three breeding populations of largemouth bass using formulated feeds[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 57-64. [樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 驯食配合饲料的大口黑鲈 3 个选育世代的遗传多样性分析[J]. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 57-64.]
- [27] Zhao L, Li S J, Bai J J, et al. Transfer food from zooplankton to formulated feed in juvenile selectively bred largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(6): 846-850. [赵萃, 李胜杰, 白俊杰, 等. 大口黑鲈选育群体幼鱼转食配合饲料的驯食研究[J]. *水产科学*, 2019, 38(6): 846-850.]
- [28] Bondari K. Training and growth of artificially fed largemouth bass in culture tanks[J]. *Aquaculture Research*, 1983, 14(3): 145-149.
- [29] Li W H, Sun C F, Dong J J, et al. Early developmental characteristics of digestive system of *Micropterus salmoides* larvae during the first feeding and artificial formula feed adaptation[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(1): 80-89. [李武辉, 孙成飞, 董浚键, 等. 大口黑鲈开口摄食与转食人工配合饲料期消化系统发育特征[J]. *渔业科学进展*, 2023, 44(1): 80-89.]
- [30] Li M X, Qiang J, Xu G C, et al. Comparison of gut structure and microbial composition changes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) at different breeding stages[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(9): 5886-5903. [李鸣霄, 强俊, 徐钢春, 等. 不同养殖阶段的大口黑鲈肠道结构和肠道微生物组成变化的比较[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(9): 5886-5903.]
- [31] Li J, Ni J, Li J, et al. Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(6): 1750-1760.
- [32] Sun X F, Pan B H, Sun D Y. Diversity, stability, and elasticity of animal gut microbiota[J]. *Feed Research*, 2013(10): 48-49, 59. [孙笑非, 潘宝海, 孙冬岩. 动物肠道菌群的多样性、稳定性和弹性[J]. *饲料研究*, 2013(10): 48-49, 59.]
- [33] Wong S, Waldrop T, Summerfelt S, et al. Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(16): 4974-4984.
- [34] Kokou F, Sasson G, Friedman J, et al. Core gut microbial communities are maintained by beneficial interactions and strain variability in fish[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(12): 2456-2465.
- [35] Sheng Z Y, Turchini G M, Xu J M, et al. Functional properties of protein hydrolysates on growth, digestive enzyme activities, protein metabolism, and intestinal health of larval largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 913024.
- [36] Zhang Z M, Li D P, Refaey M M, et al. High spatial and temporal variations of microbial community along the southern catfish gastrointestinal tract: insights into dynamic food digestion[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1531.
- [37] Yi Y H, Liang L F, Wang Z L, et al. A comparative

- metagenomics study on gastrointestinal microbiota in amphibious mudskippers and other vertebrate animals[J]. *Animals*, 2019, 9(9): 660.
- [38] Yang H L, Leng X Q, Du H, et al. Adjusting the prerelease gut microbial community by diet training to improve the postrelease fitness of captive-bred *Acipenser dabryanus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: article No.488.
- [39] Hao Y T, Wu S G, Wang G T, et al. Study on the adaptation changes of intestinal microbiota in *Ctenopharyngodon idellus* fed on different diets[J]. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(3): 46-51, 101. [郝耀彤, 吴山功, 王桂堂, 等. 草鱼肠道微生物对食物改变适应性变化的研究[J]. *淡水渔业*, 2015, 45(3): 46-51, 101.]
- [40] Gao X D, Gong Y, Chen X J, et al. Trophic niche and gut microbiota of *Dosidicus gigas* in the eastern equatorial Pacific Ocean[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2021, 32(3): 1087-1095. [高小迪, 贡艺, 陈新军, 等. 东太平洋赤道海域茎柔鱼的营养生态位和肠道微生物组成[J]. *应用生态学报*, 2021, 32(3): 1087-1095.]
- [41] Kashinskaya E N, Simonov E P, Izvekova G I, et al. Variability of composition of microbiota of gastrointestinal tract of perch *Perca fluviatilis* and Prussian carp *Carassius gibelio* during the vegetative season[J]. *Journal of Ichthyology*, 2021, 61(6): 955-971.
- [42] Knipe H, Temperton B, Lange A K, et al. Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(1): 324-352.
- [43] Coyte K Z, Schluter J, Foster K R. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability[J]. *Science*, 2015, 350(6261): 663-666.
- [44] Medina-Félix D, Garibay-Valdez E, Vargas-Albores F, et al. Fish disease and intestinal microbiota: a close and indivisible relationship[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2023, 15(2): 820-839.
- [45] Piazzon M C, Caldach-Giner J A, Fouz B, et al. Under control: how a dietary additive can restore the gut microbiome and proteomic profile, and improve disease resilience in a marine teleostean fish fed vegetable diets[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): article No.164.
- [46] Li X M, Ringø E, Hoseinifar S H, et al. The adherence and colonization of microorganisms in fish gastrointestinal tract[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(3): 603-618.
- [47] Merrifield D L, Burnard D, Bradley G, et al. Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(9): 1064-1072.
- [48] Jiang Y, Yu C Y, Xu Y J, et al. Analysis of the evolution trend of gastrointestinal tract microflora of juvenile yellowtail kingfish, *Seriola lalandi* during nutrient metabolism[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(2): 252-263. [姜燕, 于超勇, 徐永江, 等. 营养代谢过程中黄条鲷幼鱼消化道菌群的演变趋势[J]. *中国水产科学*, 2022, 29(2): 252-263.]
- [49] Carda-Diéguez M, Mira A, Fouz B. Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 87(2): 451-459.
- [50] Ringø E, Zhou Z, Vecino J L G, et al. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story?[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(2): 219-282.
- [51] Li C, Niu Z H, Zou M J, et al. Probiotics, prebiotics, and synbiotics regulate the intestinal microbiota differentially and restore the relative abundance of specific gut microorganisms[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(7): 5816-5829.
- [52] Zan Z J, Mao Q, Han Z R, et al. Changes in the intestinal microbiota of farmed northern sheatfish (*Silurus soldatovi*) associated with natural bacterial infection[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2023, 54(6): 1575-1591.
- [53] Yuan J M, Wang Z J, Wang B, et al. Non-specific immunity associated gut microbiome in *Aristichthys nobilis* under different rearing strategies[J]. *Genes*, 2021, 12(6): article No.916.
- [54] Knipe H, Temperton B, Lange A, et al. Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(1): 324-352.
- [55] Chatterjee M, Ip Y T. Pathogenic stimulation of intestinal stem cell response in *Drosophila*[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2009, 220(3): 664-671.
- [56] Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota-masters of host development and physiology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(4): 227-238.
- [57] Razak S A, Valentine S, Marsh T, et al. Compositional dynamics of gastrointestinal tract microbiomes associated with dietary transition and feeding cessation in lake sturgeon larvae[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1872.
- [58] Dehler C E, Secombes C J, Martin S A M. Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.)[J]. *Aquaculture*, 2017, 467: 149-157.
- [59] Song C Y, Wen H B, Liu G X, et al. Gut microbes reveal *Pseudomonas* medicates ingestion preference via protein utilization and cellular homeostasis under feed domestication in freshwater drum, *Aplodinotus grunniens*[J]. *Frontiers in*

- Microbiology, 2022, 13: 861705.
- [60] Korkea-aho T L, Papadopoulou A, Heikkinen J, et al. *Pseudomonas* M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(1): 24-35.
- [61] Thomas F, Hehemann J H, Rebuffet E, et al. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection[J]. Frontiers in Microbiology, 2011, 2: article No.93.
- [62] Hamed J, Poorinmohammad N, Wink J. The role of Actinobacteria in biotechnology[M]//Wink J, Mohammadipanah F, Hamed J. Biology and Biotechnology of Actinobacteria. Cham: Springer, 2017: 269-328.
- [63] Jiang Y, Wang Y G, Zhang Z, et al. Responses of microbial community structure in turbot (*Scophthalmus maximus*) larval intestine to the regulation of probiotic introduced through live feed[J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0216590.
- [64] Gonçalves A T, Maita M, Futami K, et al. Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. Fisheries Science, 2011, 77(4): 633-642.
- [65] Deng Y L, Verdegem M C J, Eding E, et al. Effect of rearing systems and dietary probiotic supplementation on the growth and gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae[J]. Aquaculture, 2022, 546: 737297.
- [66] Derrien M, Belzer C, de Vos W M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 106: 171-181.
- [67] Zhang J M, Wang Y T, Liu J H, et al. Effects of fecal bacteria on growth, digestive capacity, antioxidant capacity, intestinal health of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae[J]. Aquaculture, 2023, 562: 738796.
- [68] Li X M, Yan Q Y, Xie S Q, et al. Gut microbiota contributes to the growth of fast-growing transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64577.
- [69] Fan Z, Wu D, Li J N, et al. Assessment of fish protein hydrolysates in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) diets: Effect on growth, intestinal antioxidant status, immunity, and microflora[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 816341.
- [70] Lattos A, Giantsis I A, Karagiannis D, et al. Gut symbiotic microbial communities in the IUCN critically endangered *Pinna nobilis* suffering from mass mortalities, revealed by 16S rRNA amplicon NGS[J]. Pathogens, 2020, 9(12): 1002.
- [71] Mougín J, Joyce A. Fish disease prevention via microbial dysbiosis-associated biomarkers in aquaculture[J]. Reviews in Aquaculture, 2023, 15(2): 579-594.
- [72] Tran N T, Zhang J, Xiong F, et al. Altered gut microbiota associated with intestinal disease in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34: article No.71.
- [73] Su L X, Xu C S, Cai L, et al. Susceptibility and immune responses after challenge with *Flavobacterium columnare* and *Pseudomonas fluorescens* in conventional and specific pathogen-free rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 875-886.
- [74] Meng X L, Nie G X. Advances of intestinal microbiota and lipid metabolism of fish[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(6): 1221-1229. [孟晓林, 聂国兴. 鱼类肠道菌群与机体脂质代谢关系研究进展[J]. 中国水产科学, 2019, 26(6): 1221-1229.]
- [75] Lee H J, Kim H W, Kim M H, et al. Nitrite removal characteristics and application of *Bosea* sp. isolated from BFT system culture water[J]. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2017, 50(4): 378-387.
- [76] Suresh S, Umesh M, Santosh A S. Biological extraction of chitin from fish scale waste using proteolytic bacteria *Stenotrophomonas koreensis* and its possible application as an active packaging material[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2023: 1-11.
- [77] Wang Q J, Wang D J, Zuo Z H, et al. Effects of dietary koumine on growth performance, intestinal morphology, microbiota, and intestinal transcriptional responses of *Cyprinus carpio*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(19): 11860.
- [78] Amoah K, Liu H, Dong X H, et al. Effects of varying dietary black garlic supplementation on the growth, immune response, digestive and antioxidant activities, intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* and its resistance to *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. Aquaculture Nutrition, 2021, 27(5): 1699-1720.
- [79] Gatesoupe F J, Huelvan C, Le Bayon N, et al. The highly variable microbiota associated to intestinal mucosa correlates with growth and hypoxia resistance of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, submitted to different nutritional histories[J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): article No.266.
- [80] Menanteau-Ledouble S, Skov J, Lukassen M B, et al. Modulation of gut microbiota, blood metabolites, and disease resistance by dietary β -glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Animal Microbiome, 2022, 4(1): article No.58.

Changes in the intestinal microbiota diversity and relative abundance of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) at different diet stages

TIAN Lu¹, LI Yongji², ZHANG Yanchun³, LI Wenhui², LIANG Zhiqiang¹, XIE Zhonggui¹, YI Daqing⁴, YI Xiangkai⁴, XIAO Guangming³

1. Hunan Fisheries Science Institute, Changsha 410153, China;

2. Yueyang Agricultural Science Research Institute, Yueyang 414400, China;

3. Hunan Provincial Livestock and Fisheries Affairs Center, Changsha 410006, China;

4. Huarong County Dongshan Dongting Southern Catfish Breeding Farm, Yueyang 415000, China

Abstract: This study aimed to enhance our understanding of the changes in the intestinal microbiota of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) resulting from changes in dietary habits. The intestinal contents of 13-, 19-, 24-, and 46-day-old largemouth bass were continuously collected, representing the feeding live-bait period (LP), the first conversion diet period (CP1), the second conversion diet period (CP2), and the combination feed period (FP). 16S rRNA amplicon sequencing was used to investigate species diversity and differences in relative species abundance in the intestinal microbiota of juvenile largemouth bass. A Goods coverage value of 1 was obtained for the intestinal microbiota across all periods, suggesting that the sequencing results reflected the microorganisms present in the intestinal tract. The conversion of bait significantly affected the gut microbial diversity of the larvae and juveniles. Significant changes in species type were observed in the intestinal microbiota during CP1 and CP2, with the species composition being simpler. During LP and FP, the intestinal microbiota exhibited high evenness in species composition. The highest biodiversity and structural complexity in the intestinal microbiota were observed during FP, with 16 microbial communities having average relative abundances greater than 1% at the genus level. This number was only eight species for LP, and two or fewer species for both CP1 and CP2. Significantly higher average relative abundance values for *Pseudomonas* were observed in CP1 and CP2 (93.27% and 97.33%, respectively). Furthermore, significant differences in the relative abundance of dominant bacterial species were identified at different periods, indicating that diet conversion had a notable impact on gut-related functional microorganisms. This may be the intestinal response of largemouth bass to the absorption and utilization of feed, which has complex ingredients. This study provides preliminary data for the study of fish domestication and diet conversion and offers new insights into improving or optimizing largemouth bass feeding technology from the perspective of gut microbiota regulation.

Key words: *Micropterus salmoides*; juvenile fish; diet conversion; intestinal microbiota; diversity

Corresponding author: XIAO Guangming. E-mail: Xgm8888265@126.com